

Rec'd PCT/PTO 07 JUL 2004

REC'D 03 MAR 2003

JP 02/13879
WIPO PCT

10/500841

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

27.12.02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 1月 9日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-002056

[ST.10/C]:

[JP 2002-002056]

出 願 人

Applicant(s):

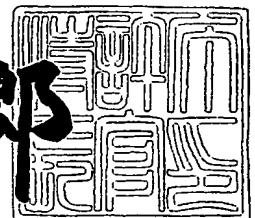
サントリー株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月12日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3006548

【書類名】 特許願

【整理番号】 DS07J617

【提出日】 平成14年 1月 9日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/10

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府豊中市上野東2-19-32-201

 【氏名】 谷口 直之

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府豊中市上新田3-6-17-212

 【氏名】 三善 英知

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東5-2-8-306

 【氏名】 斉藤 貴志

【特許出願人】

 【識別番号】 000001904

 【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100077012

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 岩谷 龍

 【電話番号】 06-4796-1300

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 066372

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血管新生作用を有する糖転移酵素GnT-V

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血管新生作用を有し、 $\beta 1, 6$ -N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの塩基性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド又はタンパク質。

【請求項2】 $\beta 1, 6$ -N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼが、下記性質；

(1) 作用：UDP-N-アセチルグルコサミンをドナー基質としてN-アセチルグルコサミンを $\alpha-6$ -D-マンノシドに転移させ；

(2) 基質特異性：GnGn-bi-PAを受容体とした時の基質特異性を100とした場合、GnGnF-bi-PAを受容体とした時の基質特異性が約78%、GnGnGn-tri-PAを受容体とした時の基質特異性が約125%、GnM-PAを受容体とした時の基質特異性が約66%であり；

(3) 至適pH：6.2-6.3；

(4) 活性：活性の発現に Mn^{2+} を必要とせず、また、20mMEDTA存在下においても活性は阻害されず；

(5) 分子量：約73,000（還元剤非存在下SDS-PAGEによる）並びに約73,000及び約60,000（還元剤存在下SDS-PAGEによる）；

(6) Km値：受容体GnGn-bi-PA及び供与体UDP-GlcNAcに対するKm値は、各々133 μ M及び3.5mMであり；

(7) 以下のペプチドフラグメントを有する：(a) Thr-Pro-Trp-Gly-Lys, (b) Asn-Ile-Pro-Ser-Tyr-Val, (c) Val-Leu-Asp-Ser-Phe-Gly-Thr-Glu-Pro-Glu-Phe-Asn-His-Ala-Asn-Tyr-Ala, (d) Asp-Leu-Gln-Phe-Leu-Leu及び(e) Asn-Thr-Asp-Phe-Phe-Ile-Gly

を有することを特徴とする請求項1に記載のペプチド又はタンパク質。

【請求項3】 $\beta 1, 6$ -N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼが、少なくとも配列番号：6で示されるアミノ酸配列を含んで成るアミノ酸配列、

又はこのアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が修飾されているアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1に記載のペプチド又はタンパク質。

【請求項4】 塩基性アミノ酸クラスター領域において、塩基性アミノ酸の数が前記領域の全アミノ酸数のうちの30%以上を占めることを特徴とする請求項1に記載のペプチド又はタンパク質。

【請求項5】 塩基性アミノ酸クラスター領域が、少なくとも配列番号：7で示されるアミノ酸配列を含んで成るアミノ酸配列、又はこのアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が修飾されているアミノ酸配列であることを特徴とする請求項1に記載のペプチド又はタンパク質。

【請求項6】 請求項1～5に記載のペプチド又はタンパク質を含有することを特徴とする血管新生促進剤。

【請求項7】 創傷治癒剤、又は動脈硬化の予防及び／もしくは治療剤である請求項6に記載の血管新生促進剤。

【請求項8】 請求項1～5に記載のペプチド又はタンパク質を用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法。

【請求項9】 請求項8に記載のスクリーニング方法において血管新生阻害作用を示す化合物。

【請求項10】 請求項9に記載の化合物を含有することを特徴とする血管新生阻害剤。

【請求項11】 ゴルジ体膜にアンカーリングされている成熟型 $\beta 1, 6-N$ -アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼを切断して分泌型 $\beta 1, 6-N$ -アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼに変換するプロテアーゼを用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法。

【請求項12】 プロテアーゼが、 β -セクレターゼであることを特徴とする請求項11に記載のスクリーニング方法。

【請求項13】 請求項11又は12に記載のスクリーニング方法において血管新生阻害作用を示す化合物。

【請求項14】 請求項13に記載の化合物を含有することを特徴とする血管新生阻害剤。

【請求項 15】 請求項 1～5 に記載のペプチド又はタンパク質の発現を抑制することを特徴とする血管新生阻害作用を示す化合物。

【請求項 16】 請求項 15 に記載の化合物を含有することを特徴とする血管新生阻害剤。

【請求項 17】 請求項 1～5 に記載のペプチド又はタンパク質が、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合するのを抑制することを特徴とする血管新生阻害作用を示す化合物。

【請求項 18】 請求項 17 に記載の化合物を含有することを特徴とする血管新生阻害剤。

【請求項 19】 請求項 1～5 に記載のペプチド又はタンパク質に対する抗体

【請求項 20】 請求項 19 記載の抗体を用いることを特徴とする請求項 1～5 記載のペプチド又はタンパク質のアッセイ方法。

【請求項 21】 請求項 19 記載の抗体を含むことを特徴とする請求項 1～5 記載のペプチド又はタンパク質の検出キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、分泌型の糖転移酵素、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-V (以下、GnT-V と略称する) の血管新生作用、当該血管新生作用に関わる GnT-V の塩基性アミノ酸クラスター、GnT-V の血管新生促進剤としての利用、GnT-V 及び GnT-V の塩基性アミノ酸クラスターの阻害剤のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られた物質、分泌型 GnT-V の産生を阻害する物質のスクリーニング方法、当該スクリーニング方法によって得られた物質、及び該物質の血管新生阻害剤としての利用に関する。

【0002】

【従来技術】

癌の増殖には、繊維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)、血管内皮細胞増殖因子 (VFGF) 及びインターロイキン-8 (IL-8) などの因子が関与している。これらの

因子及びサイトカインの産生は、遺伝子発現の増大、遺伝子産物の翻訳後の修飾及び細胞外マトリックスとの相互作用などの複雑なメカニズムによって制御されている。

【0003】

多くの増殖因子とそのレセプターは糖タンパク質であり、そのうちの幾つかは腫瘍組織での血管新生に関与している。糖転移酵素遺伝子を用いた最近の研究において、増殖因子レセプターのオリゴ糖構造の変化が細胞内シグナル伝達の変化をもたらし、このことが細胞の癌化につながるということが明らかにされている (Yamashita, K., et al., J. Biol. Chem. 260, 3963-3969 (1985). Pierce, M & Arango, J., J. Biol. Chem. 261, 10772-10777 (1986). Zhu, T.Y., et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 123, 296-299 (1997). Petretti, T., et al., Gut 46, 359-366 (2000))。アスパラギン糖鎖の β (1, 6) 分岐の形成を触媒する β 1, 6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ V (GnT-V; β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V) は、癌の転移に関与する最も重要な糖転移酵素であることが提唱されている (Demetriou, M., et al., J. Cell Biol. 130, 383-392 (1995). Dennis, J.W., et al., Science 236, 582-585 (1987))。

血管新生は、癌の転移や増殖などの癌の進行において必須の段階である (Folkman, J., N. Eng. J. Med. 285, 1182-1186 (1971). Folkman, J. Ann. Surg. 175, 409-416 (1972))。GnT-Vが欠損したトランスジェニックマウスを用いた最近の研究によれば、GnT-Vは癌の増殖と癌の転移に必須であることが直接示された (Granovsky, M., et al., Nature Med. 6, 306-312 (2000))。臨床研究によれば、肺及び肝臓の悪性腫瘍においてGnT-V活性の上昇が示されている。ヒト肺癌細胞においては、GnT-V活性と腫瘍のサイズに正の相関関係があることが示され (Dennis, J.W. & Laferte, S., Cancer Res. 49, 945-950 (1989))、ヒト大腸癌組織におけるGnT-Vの発現が、予後の悪化と転移に関係していること (Murata, K., et al., Clin. Cancer Res. 6, 1772-1777 (2000)) が明らかにされている。しかしながら、GnT-Vを介する癌の増殖・転移の詳細なメカニズムについては、まだ明らかにされていない。

【0004】

糖タンパク質中に見いだされるアスパラギン型糖鎖 (A s n型糖鎖) は、その構成糖及び分岐の型から高マンノース型、複合型及び混合型の3タイプに分類される。これらA s n型糖鎖の生合成は、先ず、粗面小胞体の内腔側で脂質中間体からその糖鎖部分が、翻訳中のポリペプチド鎖のアスパラギンにひとまとめに転移されることから始まる。その後、粗面小胞体でグルコースと一部のマンノースが除去されるが、一部の粗面小胞体局在性のA s n型糖鎖をもつ糖タンパク質はこのままとどまるため、高マンノース型糖鎖のままとなる。その他のオルガネラ糖タンパク質、細胞表層糖タンパク質あるいは分泌糖タンパク質は、ベシクル輸送によりゴルジ体に移り、さらにマンノースが除去される。このゴルジ体では、ゴルジ体酵素であるN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ群の作用によりN-アセチルグルコサミンが導入され、分枝構造をとるようになる。この分枝構造の形成により、高マンノース型糖鎖から混成型糖鎖及び複合型糖鎖への変換が始まり、フコースの導入、また、トランスゴルジ領域でのガラクトースの導入を経て、最後に、シアル酸が導入されてA s n型糖鎖の生合成が完成する。

【0005】

これら一連のA s n型糖鎖合成のそれぞれのステップで、種々の酵素が触媒として働いていることがわかっている。そのうち、A s n型糖鎖の種々の分枝構造の形成における、N-アセチルグルコサミンの転移導入反応を触媒している酵素として、6種のN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼが知られている。Schachterら (Brockhausen, I., et al., Biochem. Cell Biol., 66, 1134 (1988)) は、 $\text{Man} \alpha 1-3 (\text{Man} \alpha 1-6) \text{Man} \beta 1-4 \text{GlcNAc} \beta 1-4 \text{GlcNAc}$ のトリマンノシル構造のコア構造に、N-アセチルグルコサミンを転移するこの6種の酵素をGnT-IないしGnT-VIと命名した。このうち、GnT-Vは、 $\beta (1, 6) \text{branch}$ 構造 ($-[\text{GlcNAc} \beta (1, 6) \text{Man} \alpha (1, 6) \text{Man}] -$) の形成に関わる酵素である。 $\beta (1, 6) \text{branch}$ 構造は、細胞の形質転換株や腫瘍形成性細胞に、顕著に増加している事が知られている (Pierce, M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 146, 679-684 (1987) 及び Arango, J., & Pierce, M., J., Cell. Biochem., 257, 13421-134

27(1982))。また、腫瘍形成性細胞の癌転移能と β (1, 6) b r a n c h の出現との間に関連があることが示されている (Hiraizumi, et al., A., Arch. Biochem. Biophys. 280, 9-19, (1990))。ヒトでも、乳癌の生検例において、50%の例で β (1, 6) b r a n c h の発現が亢進していると報告されている (Dennis, J. W., & Laferte, S. Cancer Res. 49, 945-950, (1989))。いずれの場合でも、 β (1, 6) b r a n c h 構造の出現は、G n T-V 活性の上昇をともなっていることがわかっている。このように、G n T-V は、糖鎖生合成経路において β (1, 6) b r a n c h 構造の形成を触媒する点で重要であるばかりでなく、癌細胞の易転移能及び悪性度と関連するという点においても、重要な鍵となる酵素である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記の実情を鑑みてなされたものであり、その目的は糖転移酵素 G n T-V の癌転移・増殖において果たす役割を解明することにより、癌治療における最も重要な課題である癌転移・増殖に係る新たな治療ターゲット、治療剤、治療剤を見出すスクリーニング方法、評価方法、診断方法を提供することである。本発明はまた、G n T-V が癌転移並びに血管新生を促進するという新たな生化学的概念を提供することにより、G n T-V の分泌或いは発現の阻害は、癌転移の抑制だけではなく転移部位の癌増大に係る要因である血管新生を抑制することをも含めた新たな治療概念を提供するものでもある。また更に、血管新生を肯定的因子として捉えれば、血管損傷などに起因する血流障害による各種の虚血性疾患の新たな創薬ターゲットを提供するものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

発明者らは、糖転移酵素の一つである G n T-V が、本来の糖転移酵素としての機能とは全く異なる新たな機能として、癌の転位及びその後の癌の増殖において、最初の規制段階である血管新生を促進する作用を有することを見出した。即ち、分泌型 G n T-V 並びに精製された組換え G n T-V は、in vitro 及び in vivo において生理的濃度で血管新生を促進する。さらに、G n T-V のアミノ

酸配列中に、細胞表面及び細胞外マトリックスにおいてヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)から繊維芽細胞増殖因子(FGF-2)を遊離する高度の塩基性アミノ酸クラスター領域を持つことを確認した。本発明の一つは、GnT-Vの塩基性アミノ酸クラスター領域のアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質、及び当該ペプチド又はタンパク質を含有する血管新生促進剤である。

【0008】

本発明は、糖転移酵素GnT-V及び当該糖転移酵素の塩基性アミノ酸クラスター領域のアミノ酸配列を有するペプチド(塩基性ペプチド)が癌細胞表層のHSPGからFGF-2を遊離することによって血管新生を促進し、癌転移・増殖を促進することを知見した。本発明は、かかる知見に基づいて想到した、GnT-V及び上記塩基性ペプチドによる血管新生を阻害する化合物のスクリーニング方法、当該スクリーニング方法で得られた化合物、及び該化合物を含有する血管新生阻害剤である。より具体的には、下記物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られた化合物、及び該化合物を含有する血管新生阻害剤である。

- (a) GnT-V及び塩基性ペプチドによる血管新生作用を阻害する物質
- (b) ゴルジ体にある成熟型GnT-Vを切断して分泌型GnT-Vに変換するプロテアーゼを阻害する物質
- (c) GnT-Vの遺伝子発現を阻害する物質
- (d) GnT-V及び塩基性ペプチドによるヘパラン硫酸プロテオグリカンからのFGF-2の遊離を阻害する物質

【0009】

すなわち、本発明は、

- (1) 血管新生作用を有し、 $\beta 1, 6$ -N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの塩基性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド又はタンパク質、
- (2) $\beta 1, 6$ -N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼが、下記性質；
 - (a) 作用：UDP-N-アセチルグルコサミンをドナー基質としてN-アセチルグルコサミンを $\alpha-6$ -D-マンノシドに転移させ；
 - (b) 基質特異性：GnGn-bi-PAを受容体とした時の基質特異性を10

0とした場合、GnGnF-bi-PAを受容体とした時の基質特異性が約78%、GnGnGn-tri-PAを受容体とした時の基質特異性が約125%、GnM-PAを受容体とした時の基質特異性が約66%であり；

(c) 至適pH：6.2-6.3；

(d) 活性：活性の発現に Mn^{2+} を必要とせず、また、20mMEDTA存在下においても活性は阻害されず；

(e) 分子量：約73,000（還元剤非存在下SDS-PAGEによる）並びに約73,000及び約60,000（還元剤存在下SDS-PAGEによる）；

(f) Km値：受容体GnGn-bi-PA及び供与体UDP-GlcNAcに対するKm値は、各々133 μ M及び3.5mMであり；

(g) 以下のペプチドフラグメントを有する：(i) Thr-Pro-Trp-Gly-Lys（配列番号1），(ii) Asn-Ile-Pro-Ser-Tyr-Val（配列番号2），(iii) Val-Leu-Asp-Ser-Phe-Gly-Thr-Glu-Pro-Glu-Phe-Asn-His-Ala-Asn-Tyr-Ala（配列番号3），(iv) Asp-Leu-Gln-Phe-Leu-Leu（配列番号4）及び(v) Asn-Thr-Asp-Phe-Phe-Ile-Gly（配列番号5）

を有することを特徴とする前記(1)に記載のペプチド又はタンパク質、に関する。

【0010】

また、本発明は、

(3) β 1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼが、少なくとも配列番号：6で示されるアミノ酸配列を含んで成るアミノ酸配列、又はこのアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が修飾されているアミノ酸配列を有することを特徴とする前記(1)に記載のペプチド又はタンパク質、

(4) 塩基性アミノ酸クラスター領域において、塩基性アミノ酸の数が前記領域の全アミノ酸数のうちの30%以上を占めることを特徴とする前記(1)に記載のペプチド又はタンパク質、

(5) 塩基性アミノ酸クラスター領域が、少なくとも配列番号：7で示されるアミノ酸配列を含んで成るアミノ酸配列、又はこのアミノ酸配列において1又

は複数のアミノ酸が修飾されているアミノ酸配列であることを特徴とする前記（1）に記載のペプチド又はタンパク質、
に関する。

【0011】

また、本発明は、

（6） 前記（1）～（5）に記載のペプチド又はタンパク質を含有することを特徴とする血管新生促進剤、

（7） 創傷治癒剤、又は動脈硬化の予防及び／もしくは治療剤である前記（6）に記載の血管新生促進剤、

（8） 前記（1）～（5）に記載のペプチド又はタンパク質を用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法、

（9） 前記（8）に記載のスクリーニング方法において血管新生阻害作用を示す化合物、

（10） 前記（9）に記載の化合物を含有することを特徴とする血管新生阻害剤、
に関する。

【0012】

また、本発明は、

（11） ゴルジ体膜にアンカーリングされている成熟型 $\beta 1, 6-N$ -アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼを切断して分泌型 $\beta 1, 6-N$ -アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼに変換するプロテアーゼを用いることを特徴とする血管新生阻害剤のスクリーニング方法、

（12） プロテアーゼが、 β -セクレターゼであることを特徴とする前記（11）に記載のスクリーニング方法、

（13） 前記（11）又は（12）に記載のスクリーニング方法において血管新生阻害作用を示す化合物、

（14） 前記（13）に記載の化合物を含有することを特徴とする血管新生阻害剤、
に関する。

【0013】

また、本発明は、

(15) 前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質の発現を抑制することを特徴とする血管新生阻害作用を示す化合物、

(16) 前記(15)に記載の化合物を含有することを特徴とする血管新生阻害剤、

(17) 前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質が、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合するのを抑制することを特徴とする血管新生阻害作用を示す化合物、

(18) 前記(17)に記載の化合物を含有することを特徴とする血管新生阻害剤、

(19) 前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質に対する抗体

(20) 前記(19)に記載の抗体を用いることを特徴とする前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質のアッセイ方法、

(21) 前記(19)に記載の抗体を含むことを特徴とする前記(1)～(5)に記載のペプチド又はタンパク質の検出キット、
に関する。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明は、 β 1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの塩基性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド又はタンパク質を含有する血管新生促進剤を提供する。

上記 β 1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼは、公知のものであってよいが、下記の酵素学的性質を有することが好ましい。すなわち、
a) 作用：N-アセチルグルコサミンをUDP-N-アセチルグルコサミンから α -6-D-マンノシドに転移させ；

(b) 基質特異性：GnGn-bi-PAを受容体とした時の基質特異性を100とした場合、GnGnF-bi-PAを受容体とした時の基質特異性が約78

%、G n G n G n - t r i - P A を受容体とした時の基質特異性が約 125 %、
G n M - P A を受容体とした時の基質特異性が約 66 % であり；

(c) 至適 pH : 6.2 - 6.3 ；

(d) 活性：活性の発現に Mn^{2+} を必要とせず、また、20 mM EDTA 存在下においても活性は阻害されず；

(e) 分子量：約 73,000 (還元剤非存在下 SDS-PAGE による) 並びに約 73,000 及び約 60,000 (還元剤存在下 SDS-PAGE による) ；

(f) K_m 値：受容体 G n G n - b i - P A 及び供与体 UDP - G l c N A c に対する K_m 値は、各々 133 μ M 及び 3.5 mM であり；

(g) 以下のペプチドフラグメントを有する：(i) Thr-Pro-Trp-Gly-Lys (配列番号 1)，(ii) Asn-Ile-Pro-Ser-Tyr-Val (配列番号 2)，(iii) Val-Leu-Asp-Ser-Phe-Gly-Thr-Glu-Pro-Glu-Phe-Asn-His-Ala-Asn-Tyr-Ala (配列番号 3)，(iv) Asp-Leu-Gln-Phe-Leu-Leu (配列番号 4) 及び (v) Asn-Thr-Asp-Phe-Phe-Ile-Gly (配列番号 5) という性質である。

【0015】

本発明において、上記 β 1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼとしては、 β (1,6) branch 構造 (— [G l c N A c - β (1,6) M a n - α (1,6) M a n] —) の形成に関わる酵素 (以下、G n T - V という) を用いることが好ましい。なかでも、上記 β 1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼは、少なくとも配列番号：6 で示されるアミノ酸配列を含んで成るアミノ酸配列、又はこのアミノ酸配列において 1 又は複数のアミノ酸が修飾されているアミノ酸配列を有することがより好ましい。特に、上記酵素は、Nishikawa, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 198:318-327(1994) に記載のアミノ酸配列を有することがさらに好ましい。

【0016】

上記酵素は、公知の方法により容易に入手することができる。例えば、ヒト由来の G n T - V は、Shoreibah, M., et al., J. Biol. Chem. 267, 2920-2927, (1992) に記載の方法で、ラット腎より G n T - V が単離、精製することができる。特開

平6-197756に記載方法で、ヒト肺癌（小細胞癌）由来QG細胞の無タンパク質培養上清の濃縮液から単離、精製することができる。なお、当該ヒト肺癌（小細胞癌）由来のQG細胞は、Human lung carcinoma S BM331と命名され、1992年8月18日付けで独立法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号微工研条寄第3967号（FERM BP-3967）としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0017】

本発明に係る血管新生促進剤に含まれるペプチド又はタンパク質は、上記GnT-Vの塩基性アミノ酸クラスター領域を含む。前記塩基性アミノ酸クラスター領域は、GnT-Vにおいて、アミノ酸の数が5～50程度、好ましくは8～40程度、より好ましくは10～30程度の塩基性アミノ酸を多く含む部分をいう。前記塩基性アミノ酸クラスター領域においては、塩基性アミノ酸の数が前記領域の全アミノ酸数のうちの約30%以上、好ましくは約35～95%程度、より好ましくは約40～90%程度を占めていることが好ましい。

【0018】

より好ましくは、前記塩基性アミノ酸クラスター領域は、少なくとも配列番号：7で示されるアミノ酸配列を含んでなる。また、前記塩基性アミノ酸クラスター領域は、少なくとも配列番号：7で示されるアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が修飾されているアミノ酸配列を含んでなるものであってよい。具体的には、この配列番号：7で示されるアミノ酸配列に1又は複数のアミノ酸が付加されており、なお血管新生作用を維持しているペプチド；前記アミノ酸配列から1又は複数のアミノ酸が除去されており、なお血管新生作用を維持しているペプチド；又は、前記アミノ酸配列中の1又は複数のアミノ酸が他のアミノ酸により置き換えられており、なお血管新生作用を維持しているペプチド；さらには、上記のアミノ酸付加修飾、アミノ酸除去修飾及びアミノ酸置換修飾が組合わされた修飾を有し、なお血管新生作用を維持しているペプチドなど、種々の修飾型塩基性アミノ酸クラスター領域が挙げられる。上記アミノ酸の付加、除去及び置換等の修飾をうけるアミノ酸の数は、特に限定されず、当該修飾の目的に依存して決定されるが、具体的には、塩基性アミノ酸クラスター領域のアミノ酸数の30

%程度以下、好ましくは約20%程度以下、より好ましくは約10%程度以下である。また、上記アミノ酸の付加、除去及び置換等の修飾は、塩基性のアミノ酸以外において行われていることが好ましい。

【0019】

本発明に係る血管新生促進剤においては、活性成分である上記ペプチド又はタンパク質そのものであってもよいが、通常、該活性成分と薬理学的に許容される担体とを自体公知の方法〔製剤技術分野において慣用の方法、例えば日本薬局方（例えば第13改正）に記載の方法等〕にしたがって混合することによって製造される。本発明に係る血管新生阻害剤の剤形としては、例えば錠剤、カプセル剤（ソフトカプセル、マイクロカプセルを含む）、散剤、顆粒剤、シロップ剤等の経口剤；及び注射剤（例、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤等）、外用剤（例、経鼻投与製剤、経皮製剤、軟膏剤等）、坐剤（例、直腸坐剤、膣坐剤等）、ペレット、点滴剤、徐放性製剤（例、徐放性マイクロカプセル等）等の非経口剤が挙げられる。本発明に係る血管新生阻害剤は、非経口剤とすることが好ましい。

【0020】

薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などが挙げられる。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。

【0021】

賦形剤の好適な例としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが挙げられる。滑沢剤の好適な例としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。結合剤の好適な例としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。崩壊剤の好適な例としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、

カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウムなどが挙げられる。

【0022】

溶剤の好適な例としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが挙げられる。

溶解補助剤の好適な例としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。

懸濁化剤の好適な例としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが挙げられる。

【0023】

等張化剤の好適な例としては、例えば塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。

緩衝剤の好適な例としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。

無痛化剤の好適な例としては、例えばベンジルアルコールなどが挙げられる。

防腐剤の好適な例としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。

抗酸化剤の好適な例としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

【0024】

本発明に係る血管新生促進剤は、哺乳動物（例、ヒト、マウス、ラット、ウサ

ギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル等) に対して用いることができる。

本発明に係る血管新生促進剤の用途は特に限定されないが、創傷治癒剤として用いられることが好ましい。この場合の本剤の投与量は、治療すべき病態の種類、患者の年齢及び体重、症状及び疾患の重篤度などにより異なるので一概には言えないが、約 $0.01 \sim 100 \text{ mg/kg}$ 程度、好ましくは約 $0.1 \sim 50 \text{ mg/kg}$ 程度である。特に、本発明に係る血管新生促進剤を、創傷部位に、液剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、パップ剤等の方法により局所適用し、経皮吸収により創傷を治癒させる場合は、例えば、上記ペプチド又はタンパク質を約 $0.001 \sim 1000 \text{ mg/ml}$ 、さらに好ましくは約 $0.01 \sim 500 \text{ mg/ml}$ の濃度で適用することができる。

【0025】

また、本発明に係る血管新生促進剤は、動脈瘤；冠動脈硬化症、脳動脈硬化症もしくは末梢動脈硬化症などの動脈硬化症；末梢動脈閉塞、急性心筋梗塞（AMI）、深部静脈血栓、肺塞栓、解離性動脈瘤、一過性脳虚血発作（TIA）、脳卒中及び他の閉塞関連障害、不安定狭心症、汎発性血管内凝固（DIC）、敗血症、外科又は感染性ショック、術後及び分娩後外傷、心肺バイパス外科手術、不適合輸血、胎盤早期剥離、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、蛇毒及び免疫病のごとき過剰凝集による急性又は慢性の腎疾患、炎症、溶血性尿毒症性症候群、対象性末梢性壊死、褥創の治療又は予防に用いることができる。さらに本発明にかかる血管新生促進剤は、血栓溶解剤の作用増強と再閉塞防止、PTCA後の再閉塞防止、透析による血小板減少症の防止、人工血管及び臓器による血栓防止に用いることができる。

本発明に係る血管新生促進剤を上記用途に用いる場合、その投与量は、血管新生促進剤の用途、治療すべき病態の種類、患者の年齢及び体重、症状及び疾患の重篤度などにより異なるので、一概には言えないが、1日約 $0.01 \sim 100 \text{ mg/kg}$ であり、好ましくは約 $0.1 \sim 50 \text{ mg/kg}$ である。特に、静脈投与する場合は、その投与量は、1日約 $0.01 \sim 5 \text{ mg/kg}$ であり、好ましくは約 $0.04 \sim 1.5 \text{ mg/kg}$ である。この量を1日1～3回程度投与するのが望ましい。

【0026】

本発明の血管新生促進剤において、本発明に係るペプチド及びタンパク質の血管新生作用に悪影響を及ぼさない併用薬剤を用いることができる。併用薬剤としては、特に限定されないが、本発明の血管新生促進剤を動脈硬化などの治療又は／及び予防剤として用いる場合は、例えば、「高血圧治療薬」、「高脂血症治療薬」、「利尿剤」、「血栓溶解剤」などが挙げられる。

本発明に係る血管新生阻害剤及び併用薬剤の投与時期は限定されず、これらを、投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。併用薬剤の投与量は、臨床上用いられている投与量に準ずればよく、投与対象、投与対象の年齢及び体重、症状、投与時間、剤形、投与方法、組み合わせ等により適宜選択することができる。併用薬剤の投与形態は、特に限定されず、投与時に本発明に係る血管新生促進剤と併用薬剤とが組み合わせられていればよい。

【0027】

本発明は、 $\beta 1, 6-N$ -アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの塩基性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド又はタンパク質に対する抗体を提供する。前記ペプチド又はタンパク質を抗原とする抗体は、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体のいずれでもよい。それらの抗体は、例えば、「タンパク質・酵素の基礎実験法 改訂第2版（堀尾武一編集 南江堂発行 1994年）」又は「Method in Enzymology vol.182 published by ACADEMIC PRESS, INC. 1990」などに記載の公知方法に従って作製することができる。

【0028】

また、本発明は、これらの抗体を用いた前記血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質のアッセイ方法及び当該アッセイ方法を利用する前記血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の検出キットを提供する。かかるアッセイ方法及び検出キットは、種々の用途に利用可能である。例えば、癌の転移において血管新生は必須工程であることから、本発明に係るアッセイ方法及び検出キットを用いて、癌患者の血中又は癌組織における上記前記血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の有無又は量を測定することにより、癌転移の可能性を知ることができる。

本発明に係るアッセイ方法及び検出キットにおいては、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 Fab' 、あるいは Fab 画分を用いてもよい。

【0029】

前記アッセイ方法又は検査キットの作製は、公知の方法が利用できる。例えば、上記抗体を用いる上記血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の定量法は、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的又は物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法及びサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度及び特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

【0030】

本発明に係るアッセイ方法の具体的態様を以下に述べるが、本発明は以下の態様に限られない。すなわち、前記アッセイ方法としては、例えば（i）上述した血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質に対する抗体と、被検液と、標識化されている上記血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質（以下、この欄において単に「標識ペプチド」という）とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識ペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の上記血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の定量法が挙げられる。また、（ii）上述した血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質に対する抗体を担体に保持させ不溶化する。また、前記不溶化した抗体とは異なる部位を認識する血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質に対する抗体を標識する。ついで、被検液と、担体上に不溶化した抗体と、標識した抗体とを同時あるいは連続的に反応させる。次いで、担体上に抗原（血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質）を介して捕捉されている標識剤の活性又は／及び担体上に捕捉されなかった標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の定量法も挙げられる。また、本発明の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質のアッセイ方法として、かかるペプチド又はタンパク質に対する

モノクローナル抗体を用いて血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の定量を行えるほか、組織染色等による検出を行うこともできる。

【0031】

本発明にかかるアッセイ方法のうち標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。前記放射性同位元素としては、例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 又は ^{14}C などが用いられる。前記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。前記蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。前記発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0032】

本発明は、血管新生阻害剤を提供する。本発明にかかる血管新生阻害剤は（a）上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質を用いるスクリーニング方法において血管新生阻害作用を示す化合物、（b）ゴルジ体膜にアンカーリングされている成熟型 $\beta 1, 6\text{-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ}$ を切断して分泌型 $\beta 1, 6\text{-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ}$ に変換するプロテアーゼの活性を阻害する化合物、（c）上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現を抑制する化合物、及び（d）上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質がヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合するのを抑制する化合物からなる群から選ばれる1以上の化合物を含むことを特徴とする。以下に、上記（a）～（d）の化合物について詳述する。

【0033】

上記（a）上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質を用いるスクリーニング方法において血管新生阻害作用を示す化合物は、下記のようなスクリーニング方法により得ることができる。すなわち、該スクリーニング方法としては、実施例に詳細に記載した血管新生を観察する系において、上述の血管新生作

用を有するペプチド又はタンパク質と被検物質とを存在させた場合の血管新生を観察し、被検物質が存在しない場合の血管新生と比較するという方法が挙げられる。かかるスクリーニング方法において、被検物質とを存在させた場合の血管新生が、被検物質が存在しない場合の血管新生に比して少ない場合は、かかる被検物質は血管新生阻害作用を示す物質であるといえる。より具体的には、被検物質を存在させた場合の顕微鏡写真から測定できる新生された血管の長さの合計が、被検物質が存在しない場合のそれに対して、約90%以下、好ましくは約80%以下、より好ましくは約70%以下となっていれば良い。

【0034】

ここで、上記スクリーニング方法に用いる被検物質としては特に限定されず、タンパク質であってもよいし、低分子化合物であってもよいし、高分子化合物でもよい。また、精製された物質であってもよいし、複数の物質が共存している混合物であってもよい。さらに、微生物の培養液などの自然界由来のものであってもよいし、化学合成によって合成されたものでもよい。また、被検物質は、新規化合物であっても、公知化合物であってもよい。以下のスクリーニング方法においても同様である。

【0035】

(b) ゴルジ体膜にアンカーリングされている成熟型GnT-Vを切断して、ゴルジ体膜から遊離させ、分泌型GnT-Vに変換するプロテアーゼの活性を阻害する化合物は、前記プロテアーゼを用いるスクリーニング方法により容易に得ることができる。前記プロテアーゼを用いるスクリーニング方法としては、特に限定されず、被検物質の存在下に、前記プロテアーゼをゴルジ体膜にアンカーリングされている成熟型GnT-Vに作用させることにより生じる分泌型GnT-Vが、被検物質の非存在下におけるそれと比べて少ない場合は、かかる被検物質は、プロテアーゼの活性を阻害する化合物であるといえる。また、試験管内で前記プロテアーゼの活性を阻害する被検物質をスクリーニングしてもよい。

前記プロテアーゼとしては、例えば β -セクレターゼなどが挙げられる。該 β -セクレターゼは、そのアミノ酸配列がVassar, R., et al., Science 286, 735-741(1999)などに記載されており、またGenBank accession number AF190725な

どの情報から、容易に入手することができる。

【0036】

(c) 上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現を抑制する化合物は、公知の方法により得ることができる。例えば、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現のためのプロモーターと、レポーター遺伝子を用いる方法（横田崇、新井賢一著、バイオマニュアルシリーズ4、羊土社(1993)）が挙げられる。より具体的には、上記プロモーターをレポーター遺伝子の翻訳領域に連結して発現ベクターを作製し、前記発現ベクターを宿主細胞に導入して形質転換細胞を作製し、該形質転換細胞を一定時間培養し、その後、被験物質の任意の量を添加し、一定時間後の該細胞が発現するレポーターの量を酵素活性として、又は発現タンパク質の量として測定することによって行うことができる。より具体的には、被検物質の存在下でのレポーター遺伝子の発現量が、被検物質の非存在下でのレポーター遺伝子の発現量に比して少ない場合、かかる被検物質は、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現を抑制する物質であるといえる。

【0037】

上記方法において、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現のためのプロモーターとしては、GnT-V遺伝子上流のプロモーター領域を用いることが好ましい。かかるプロモーターは、GnT-V遺伝子の5'-上流領域をHuCC-T1細胞のゲノムからクローニングする（Saito, H., et al., Eur. J. Biochem. 233, 18-26 (1995)）ことにより得ることができる。HuCC-T1細胞は、Japanese Cancer Resources Bankから得ることができる。

また、上記方法において、レポーター遺伝子としては、その発現産物の活性又は生産量（mRNAの生産量も含まれる）を当業者が測定可能なものであれば、いかなるペプチド、タンパク質をコードする遺伝子を用いてもよい。例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、 β -ガラクトシダーゼ（ β -Gal）、ルシフェラーゼ等を酵素活性を測定することで利用できる。また、分泌型成長ホルモンなどは、免疫抗体反応法などでその生産量を測定することで利用することができる。

【0038】

上記発現ベクターは、上記プロモーター及びレポーター遺伝子の翻訳領域を、複製可能なベクター中に挿入することによって得ることができる。該複製可能なベクターとしては特に限定されないが、例えば大腸菌内で複製可能なものとして、pUC18又はpGEM-3Zなどが挙げられる。前記発現ベクターを宿主細胞に導入して形質転換細胞を作製する。宿主細胞は、特に限定されず、発現ベクターの種類により適宜選択することができる。また、かかる形質転換は、通常の方法によって行うことができる。また、本発明に用いられる形質転換細胞としては、発現ベクターが安定的 (stable) に宿主染色体に組み込まれるものの他、発現ベクターが一時的 (transient) に宿主に導入されるものが用いられる。発現ベクターが安定的に宿主染色体に組み込まれるものの選択は、導入したいベクター内に選択マーカー遺伝子を組み込んだベクター、又は、導入したいベクターと同時に選択マーカーを含むベクターで宿主細胞を形質転換し、該選択マーカーを有しているものだけが生存できる培地で該形質転換された細胞を培養することによって行うことができる。

【0039】

より好ましくは、下記方法により上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質の発現を抑制する化合物を得ることができる。すなわち、(a) 下記の塩基配列：5' - GGGAGTGAGGATGATGTAGGGAAG - 3' (配列番号：8)、5' - ATGGGGGCAGAGGAACCTTACGTTAT - 3' (配列番号：9)、又はその少なくとも一方を含有するDNAと；(b) Ets-1タンパク質又はその断片と；(c) 被検物質と、を一緒にインキュベートし、そして前記DNA (a) とEts-1タンパク質又はその断片との結合を測定するという方法である。

GnT-V遺伝子の転写は、GnT-V遺伝子上流のプロモーター領域のうち上記配列で示した特定の部位にEts-1タンパク質が結合することにより促進する。ペプチド又はタンパク質は、少なくともGnT-Vの塩基性アミノ酸クラスター領域を含む。したがって、前記配列のDNAとEts-1タンパク質又はその断片との結合を阻害する被検物質は、上述の血管新生作用を有するペプチ

ド又はタンパク質の発現を抑制することができる。

【0040】

上記配列のDNAとEts-1タンパク質又はその断片との結合を測定する方法としては、公知の方法を用いてよい。かかる測定方法の好ましい態様としては、ゲルシフトアッセイ及びスーパーシフトアッセイが挙げられ、これらの方法について下記に詳述する。

【0041】

ゲルシフトアッセイは、例えば、下記のように行う。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (Amersham Corp.) を用いて、上記配列のDNAの5'-延長端をラベルする。得られた ^{32}P ラベルされたDNA (10,000 cpm) と、MOLT4細胞のインビトロで転写され/翻訳された切断Ets-1タンパク質又は核抽出物を、65 mM KCl、25 mM トリス-HCl (pH 7.9)、6 mM MgCl_2 、0.25 mM EDTA及び10%グリセロールを含む緩衝液と共に20 mlの合計体積で混合する。ついで、2 μg のポリ(dI-dC) (Sigma社製) を反応混合物に添加する。ついで、反応混合物を室温で1時間培養する。得られた培養液を、6%の非変性ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド=29:1)、0.5 \times TBE (1 \times TBE=89 mM トリス、89 mM ホウ酸、2 mM EDTA) 上に付加し、そして次に電気泳動を4 $^{\circ}\text{C}$ 、150 Vで1時間行う。電気泳動の後、ゲルをゲルドライヤーにより乾燥せしめ、そして次にX線フィルム(コダック社製)に暴露する。

【0042】

ゲルシフトアッセイにおいては、上記配列のDNAとEts-1タンパク質又はその断片との複合体が示す非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動における移動度が、Ets-1タンパク質又はその断片と結合していない上記配列のDNAが示すそれに比して小さくなる。そこで、上記反応混合物に被検物質を所望量添加したときに、上記のような操作によって得られる電気泳動の結果において、上記配列のDNAとEts-1タンパク質又はその断片との複合体が示すバンドが観察されないか、そのバンドの量が少なくなっていれば、被検化合物は、上記配列のDNAとEts-1タンパク質又はその断片との結合を阻害する物

質であると判断できる。

【0043】

スーパーシフトアッセイは、反応混合物に、さらに他の E t s ファミリーのタンパク質と交差反応しない抗-E t s -1 I g G (Cambridge Research Biochemicals) を添加する以外は、ゲルシフトアッセイと全く同様に行う。

スーパーシフトアッセイにおいては、上記配列の DNA と E t s -1 タンパク質又はその断片との複合体が示す非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動における移動度が、E t s -1 タンパク質又はその断片と結合していない上記配列の DNA が示すそれに比して、ゲルシフトアッセイのときよりもさらに小さくなる。そこで、上記反応混合物に被検物質を所望量添加したときに、上記のような操作によって得られる電気泳動の結果において、上記配列の DNA と E t s -1 タンパク質又はその断片との複合体が示すバンドが観察されないか、そのバンドの量が少なくなっていれば、被検化合物は、上記配列の DNA と E t s -1 タンパク質又はその断片との結合を阻害する物質であると判断できる。

【0044】

(d) 上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質がヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan) に結合するのを抑制する化合物は、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質がヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合しないようにする化合物はもちろん、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質と、ヘパラン硫酸プロテオグリカンとの親和性を小さくする化合物であってもよい。上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質は、F G F -2 (fibroblast growth factor-2) と競合して、細胞表面又は及び細胞外マトリクス上のヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合する。また、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質のほうが、F G F -2 よりもヘパラン硫酸プロテオグリカンとの親和性が高いため、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合している F G F -2 をヘパラン硫酸プロテオグリカンから解離させる。そのようにして生じた遊離 F G F -2 が内皮細胞などを刺激して血管新生が起こる。そのため、上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質がヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合しないようにするか、又はヘパラン硫酸プ

ロテオグリカンとの親和性を小さくする化合物を存在させれば、FGF-2を優位にヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合することができ、上述のような血管新生の過程が進行しない。

【0045】

上述の血管新生作用を有するペプチド又はタンパク質がヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合するのを抑制する化合物としては、例えば、かかるペプチド又はタンパク質が有する塩基性アミノ酸クラスター領域をブロックする化合物などが挙げられる。かかる化合物としては、具体的には、例えば、酸性アミノ酸を多く含む酸性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド又はタンパク質が挙げられる。前記酸性アミノ酸クラスター領域としては、アミノ酸の数が5～50程度、好ましくは8～40程度、より好ましくは10～30程度の酸性アミノ酸を多く含む部分が好ましい。前記酸性クラスター領域においては、酸性アミノ酸の数が前記領域の全アミノ酸数のうちの約30%以上、好ましくは約35～95%程度、より好ましくは約40～90%程度を占めていることが好ましい。

【0046】

本発明に係る血管新生阻害剤は、活性成分である上記(a)～(d)の化合物のうち少なくとも1種類の化合物そのものであってもよいが、通常、該活性成分と薬理学的に許容される担体を自体公知の方法〔製剤技術分野において慣用の方法、例えば日本薬局方（例えば第13改正）に記載の方法等〕にしたがって混合することによって製造される。本発明に係る血管新生阻害剤の剤形としては、例えば錠剤、カプセル剤（ソフトカプセル、マイクロカプセルを含む）、散剤、顆粒剤、シロップ剤等の経口剤；及び注射剤（例、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤等）、外用剤（例、経鼻投与製剤、経皮製剤、軟膏剤等）、坐剤（例、直腸坐剤、膣坐剤等）、ペレット、点滴剤、徐放性製剤（例、徐放性マイクロカプセル等）等の非経口剤が挙げられる。なかでも、本発明に係る血管新生阻害剤は、非経口剤とするのが好ましい。ここで、薬学的に許容される担体としては、上述のようなものが挙げられる。

【0047】

本発明に係る血管新生阻害剤は、哺乳動物（例、ヒト、マウス、ラット、ウサ

ギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル等）に対して用いることができ、その投与量は、血管新生阻害剤の有効成分の種類、治療すべき病態の種類、患者の年齢及び体重、症状及び疾患の重篤度などにより異なるので、一概には言えない。

【0048】

本発明に係る血管新生阻害剤の用途は特に限定されないが、血管新生を伴う種々の疾患、例えば腫瘍〔例、悪性黒色腫、悪性リンパ腫、消化器（例、胃、腸など）癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、乳癌、肝臓癌、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、腎癌、膀胱癌、脳腫瘍、カポジ肉腫、血管腫、骨肉腫、筋肉腫、血管線維腫など〕、炎症性疾患（例、関節リウマチ、乾癬など）、糖尿病網膜症、アテローム性動脈硬化症（アテローム性動脈硬化巣外膜の異常毛細血管網形成における異常な脈管形成を含む）などの予防・治療剤として用いられる。また、本発明の血管新生阻害剤は、目の充血の治療剤としても用いることができる。

【0049】

本発明の血管新生阻害剤において、上記（a）～（d）の化合物の血管新生阻害作用に悪影響を及ぼさない併用薬剤を用いることができる。このような併用薬剤としては、例えば「抗腫瘍薬」、「悪液質改善薬」、「インスリン抵抗性改善薬以外の糖尿病治療薬」、「糖尿病合併症治療薬」、「抗肥満薬」、「高血圧治療薬」、「高脂血症治療薬」、「利尿剤」などが挙げられ、2種類以上を組み合わせてもよい。また、本発明の血管新生阻害剤を用いる際に、外科療法（手術）あるいは放射線療法を行ってもよい。

【0050】

本発明に係る血管新生阻害剤及び併用薬剤の投与時期は限定されず、これらを、投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。併用薬剤の投与量は、臨床上用いられている投与量に準ずればよく、投与対象、投与対象の年齢及び体重、症状、投与時間、剤形、投与方法、組み合わせ等により適宜選択することができる。併用薬剤の投与形態は、特に限定されず、投与時に本発明に係る血管新生阻害剤と併用薬剤とが組み合わせられていればよい。

【0051】

【実施例】

以下に、実施例によって本発明を詳細に説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

【0052】

〔実施例1 GnT-V形質転換細胞の転移によるヌードマウスの血管新生の促進

〕

GnT-Vの発現が大腸癌の転移と予後の悪化に高い相関性を示すことから、ヒト大腸癌細胞WiDrを用いて、GnT-Vの安定な形質転換細胞とともに、コントロールとして β 1, 4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-III (GnT-II; β 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase-III) 及び α 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ (FucT; α 1,6-fucosyltransferase)の形質転換細胞を作成し、ヌードマウスの皮下に注射して癌転移に及ぼす影響を調べた。ヒト大腸癌細胞株WiDrを10%の子ウシ血清 (FBS ; fetal bovine serum) 及び抗生物質 (ペニシリン及びストレプトマイシン) を含むRPMI-1640培地 (GIBCO BRL.社製) で培養した。形質転換は、CELL FECTIN (登録商標) 試薬 (GIBCO BRL.社製) を用いて行い、形質転換の方法はCELL FECTIN (登録商標) の説明書に従って行った。上記形質転換された癌細胞のヌードマウスへの移植は、上記それぞれの糖転移酵素で形質転換した 5×10^5 の細胞をヌードマウスの背中に注射し、1ヶ月後に癌の形成と血管新生を肉眼的に観察した。WiDr細胞はもともと上記の糖転移酵素をわずかしき発現していないが、GnT-V形質転換細胞を移植したヌードマウスには、他の糖転移酵素遺伝子で形質転換したWiDr細胞を移植したヌードマウスに比較して、癌転移の促進が認められ、腫瘍組織において著しい血管新生が認められた。この結果は、GnT-Vを過剰発現している癌細胞では、血管新生を促進する何らかの因子を分泌していることを示唆している。

【0053】

〔実施例2 GnT-V形質転換細胞による血管新生の誘導〕

GnT-V形質転換細胞による血管新生促進を、ニワトリ受精卵の胚を用いたCAM (chorioallantoic membrane) アッセイによって確認した。CAMアッセイは、Yenらの方法 (Yen, L., et al., Oncogene 19, 3460-3469 (2000)) 及びBernardiniの方法 (Bernardini, G., et al., Blood 96, 4039-4045 (2000)) を若干改良

して行った。白色レグホンの受精後8日のCAMを用い、 1×10^5 の細胞をコラーゲンスポンジの上に植え、4時間保持した。コラーゲンスポンジ上のCAMの上に5 mmのシリコンリングを置き、48時間保持した。実施例1に記載の糖転移酵素遺伝子で形質転換したWiDr細胞の中で、GnT-V形質転換細胞にだけコラーゲンスポンジ中への血管の侵入が増加していることが認められた。また、WiDr細胞及びCOS-1細胞やCHO細胞のような非癌性細胞にGnT-V遺伝子を一過性に形質転換した細胞においても、上記GnT-Vの安定な形質転換細胞と同様にCAMアッセイによって血管新生の促進が認められた。これらの結果は、GnT-Vの発現によって血管新生が促進されるのに共通の機構が存在することを強く示唆している。

【0054】

〔実施例3 GnT-V形質転換細胞の培養液による血管新生の誘導〕

GnT-V形質転換細胞による血管新生の誘導を試験管内で評価するために、Sokerらの方法(Soker, S., et al., J. Biol. Chem. 272, 31582-31588 (1997))によってGnT-V形質転換細胞の培養液で刺激した後のヒト臍帯静脈上皮細胞(HUVEC; human umbilical vein epithelial cell)のDNA合成量を測定した。タイプIコラーゲンでコーティングした96穴プレートに、HUVECをウェルあたり 2×10^3 細胞になるように植え、24時間後に、培地を0.1%子ウシ血清アルブミンを含むMCDB131培地(FBSとFGF-2を含まない)に交換し、24時間飢餓状態にした。培地を、実施例1に記載の糖転移酵素遺伝子で形質転換したWiDr細胞の培養液と交換し、24時間HUVECを刺激した。HUVECを $[^3\text{H}]$ -チミジン($[^3\text{H}]$ -thymidine)($1 \mu\text{Ci/ml}$)とともに8時間保持し、 $[^3\text{H}]$ -チミジンのHUVECへの取り込みを、MicroBeta-Counter(Wallac社製)で分析して、DNA合成量を測定した。結果は6ウェルのアッセイの結果の平均値で示し、標準偏差を測定した。全ての実験は少なくとも3回繰り返し、同じ結果が得られた。図1から明らかなように、GnT-V遺伝子で形質転換したWiDr細胞の培養液で刺激されたHUVECのDNA合成は増加したが、他の糖転移酵素遺伝子で形質転換したWiDr細胞の培養液では同様の効果は認められなかった。これらの結果は、GnT-V遺伝子で形質転換したWiDr細胞がGnT-Vの過剰発現に由来する血管新生因子を培養液中に分泌していることを示している。

【0055】

〔実施例4 組換えGnT-VのHUVECの分化・増殖に及ぼす影響〕

GnT-V遺伝子で形質転換したWiDr細胞の培養液中に存在する血管新生因子の精製を、各種カラムクロマトグラフィーを用いて行った。各画分の血管新生活性は、実施例3に記載したHUVECの分化・増殖で評価した。ヘパリン・アフィニティークロマトグラフィーにおいて、HUVECの増殖活性が高い画分が0.3 M NaClで溶出した。この性質は、FGF-1、FGF-2、VEGF、胎盤由来増殖因子(PlGF)及び肝細胞増殖因子(HGF)などの公知の増殖因子が0.8-1.5 M NaClで溶出されるので(Hauser, S. & Weich H.A., Growth Factor 9, 259-268 (1993). Gohda, E., et al., J. Clin. Invest. 81, 414-419 (1998). Marez, A., et al., Biochimie 69, 125-129 (1987). Risau, W., et al., The EMBO J. 7, 959-962 (1988). Rothenthal, R.A., et al., Growth Factor 4, 53-59 (1990))、これら公知の増殖因子の性質と全く異なる。WiDr細胞自身はこのような血管新生因子を産生しない。ヘパリン・アフィニティークロマトグラフィーにおいて0.3 M NaClで溶出される画分を、抗GnT-V抗体を用いたウェスタンブロット分析を行ったところ、抗GnT-V抗体の反応とHUVECの分化・増殖活性が一致し、当該画分に存在するHUVECの分化・増殖活性を有する主要なタンパク質がGnT-Vそのものであることを確認した。

【0056】

GnT-Vは、他の糖転移酵素(Gu, J., et al., J. Biochem. 113, 614-619 (1993). McCaffery, G. & Jamison, J.C., Comp. Biochem. Physiol. B. 104, 91-94 (1993). Ugarte, M.A. & Rodriguez, P., J. Biochem. 23, 719-726 (1991))と同様、GnT-Vは癌細胞から分泌されること(Chen, L., et al., Glycoconjugate J. 12, 813-823 (1995))が知られているが、それらの糖転移酵素の分泌の生理学的意義については知られていない。分泌型GnT-V自身がHUVECの分化・増殖を誘導するという仮説を実証するために、膜貫通部分を欠くが糖転移酵素活性は保持されているGnT-V Δ 73という組換えGnT-Vを作成した。組換えGnT-Vで可溶性のGnT-V Δ 73は、Sasaiらの文献(Sasai, K., et al., Glycobiology (in press))に開示された方法に従い、バキュロウィルスのシステムで調製した。図2に示す

ように、GnT-V Δ 73の組換えGnT-Vを添加することにより、HUVECの分化・増殖が添加量依存的に増加した。用いたGnT-V Δ 73の濃度は生理的範囲にあり、GnT-V形質転換細胞の培養液中に存在するGnT-Vは、GnT-V Δ 73の比活性を基準にすると、140 ng/mlになった。さらに、B16-F10のマウスメラノーマ細胞は高い内在性のGnT-V活性があり、B16-F10細胞の培養液は70 ng/mlのGnT-Vを含有しており、B16-F10細胞もCAMアッセイで同様の血管新生活性を示した。また、組換えFuc-Tの添加は、いかなるHUVEC増殖促進活性も示さなかった。これらの結果は、生理的濃度範囲内の分泌型GnT-VがHUVECの増殖促進活性を有していることを示している。

【0057】

〔実施例5 HUVECの分化・増殖に關与するGnT-Vのドメイン解析〕

GnT-VのどのドメインがHUVECの増殖促進活性に關与するかを明らかにするために、図3Aに示したGnT-Vの欠失変異体を作成した。GnT-V Δ 188プラスミドの作成法はSasaiらの文献 (Sasai, K., et al., Glycobiology (in press)) に開示されている。GnT-V Δ 233遺伝子をもつトランスファープラスミドは、GnT-V Δ 188プラスミドをEcoRI及びEagIで切断して得られる、ヒトGnT-VのGlu234からLeu741及びC末端のポリヒスチジンタグをコードする1521塩基対のDNA断片を、トランスファーベクターpAcGP67-A (PharMingen社) のEcoRI-EagIサイトに結合して作成した。GnT-V Δ 436遺伝子をもつトランスファープラスミドは、GnT-V Δ 188プラスミドをEcoRV及びEagIで切断して得られる、ヒトGnT-VのIle437からLeu741及びC末端のポリヒスチジンタグをコードする912塩基対のDNA断片を、トランスファーベクターpAcGP67-AのEcoRV-EagIサイトに結合して作成した。組換えバキュロウィルスを作成するために、文献公知の方法 (Ikeda, Y., et al., J. Biochem. 128, 609-619 (2000)) に従って、上記で得られたトランスファープラスミドで昆虫細胞Sf21を形質転換した。形質転換したSf21細胞に由来する組換え糖転移酵素は、Sasaiらの文献 (Sasai, K., et al., Glycobiology (in press)) に開示された方法に従い、Ni²⁺-キレートリングアフィニティークロマトグラフィーで精製した。

【0058】

図3Bに示すように、GnT-V Δ 73、GnT-V Δ 188及びGnT-V Δ 233の変異体はHUVEC

の増殖・分化亢進作用を有していたが、GnT-V Δ 436はHUVECの増殖・分化亢進作用がなかった。GnT-V Δ 73及びGnT-V Δ 188は糖転移酵素活性があるが、GnT-V Δ 233及びGnT-V Δ 436には糖転移酵素活性はなかった。これらの結果は、HUVECの増殖促進活性がGnT-Vの234番目から436番目までのアミノ酸配列に対応する領域に存在し、この領域は糖転移酵素活性に関わる領域を含まないことを示唆している。

【0059】

〔実施例6 血管新生を誘導するGnT-Vの塩基性アミノ酸クラスター領域の同定〕

ヒトGnT-Vの254番目から269番目までのアミノ酸配列は、塩基性アミノ酸がクラスターになった、Lys-Ser-Val-Arg-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-Gln-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Lysの配列（配列番号7）であり、この配列に非常に似た配列がVEGF₁₈₉（Hauser, S. & Weich H.A., Growth Factor 9, 259-268 (1993)）の142から157番目のアミノ酸配列に認められる（図4参照）。このアミノ酸クラスター領域は、PIGF-2及びヘパリン結合型表皮増殖因子様増殖因子（HB-FGF）にも保存されており（図4参照）、ヘパリン結合モチーフとして働いている（Hauser, S. & Weich, H.A., Growth Factor 9, 259-268 (1993)）。Barillariらは、PIGF-2由来のGly-Arg-Gly-Lys-Arg-Arg（配列番号10）の配列を持つ塩基性ペプチドが、細胞表層及び／又は細胞外マトリックス上のヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）からFGF-2を遊離することにより、表皮細胞の増殖を誘導することを報告している（Barillari, G., et al., American J. Pathol. 152, 1161-1166 (1998)）。

【0060】

GnT-Vの、264番目から269番目のアミノ酸配列であるLys-Arg-Lys-Arg-Lys-Lys（配列番号11）からなる塩基性ペプチド（KKRKKKペプチド）、及び291番目から296番目のアミノ酸配列であるPhe-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu（配列番号12）からなる非塩基性のコントロールペプチド（FSGGPLペプチド）を合成し、これらのペプチドのHUVECの増殖に及ぼす影響を調べた。ペプチドの合成はペプチド合成機A432（Applied Biosystems社製）で合成し、逆相HPLCで精製した後、分子量と精製度をMALDI TOF-MS（Voyager-DE（登録商標） RP; PerSeptive Biosystem

s社製)で確認した。FGF-2の濃度は公知の方法 (Barillari, G., et al., American J. Pathol. 152, 1161-1166 (1998)) で測定した。すなわち、ウェルあたり 5×10^4 細胞のHUVECをコラーゲンでコートした12穴プレートに植え、PBSで2回洗浄後、培地をMCDB131/0.1% BSA (0.5 ml/well)に交換し、ヘパリンと共に、GnT-V Δ 73、GnT-V Δ 436、KRKRKKペプチドもしくはFSGGPLペプチドの存在又は非存在下、4℃で2時間プレート回転台で保持した。4℃、3000 rpm、5分の遠心後、上清を回収し、上清中のFGF-2濃度をFGF-2 ELISA システム(R&D Systems社製)で、当該システムの説明書に従って測定した。

【0061】

上述のように、HUVECの培養液にGnT-Vの各種欠失変異体及び合成ペプチドを4℃で添加し、HUVEC上のHSPGから遊離するFGF-2の量を測定した結果、図5に示すように、GnT-V Δ 73及びKRKRKKペプチドはFGF-2を遊離したが、GnT-V Δ 436及びFSGGPLペプチドはFGF-2の遊離に影響しなかった。GnT-V Δ 73と同様、GnT-V Δ 188及びGnT-V Δ 233もFGF-2を遊離した。同様に、HSPG結合分子のヘパリン結合サイトと競合することによって当該HSPG結合分子を遊離することが知られているヘパリン (Biard, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2324-2328 (1988)) は、FGF-2の遊離を誘導した。遊離したFGF-2の刺激によるHUVEC上のFGFレセプターのリン酸化も確認した。図6に示すように、KRKRKKペプチドは、GnT-V Δ 73と同程度にHUVECの増殖を促進したが、この効果は同時に添加した抗FGF-2中和抗体によって完全に抑制された。これらの結果は、GnT-Vの塩基性アミノ酸クラスター領域はHUVEC増殖促進活性に十分であり、GnT-Vタンパク質は当該タンパク質の塩基性部分の作用によって、内皮細胞上のHSPGからFGF-2を遊離することにより血管新生を促進することを示唆している。

【0062】

〔実施例7 GnT-Vタンパク質によるin vivoでの血管新生〕

GnT-Vによる血管新生の誘導は、HUVECを用いた、キャピラリー様チューブ形成アッセイ (Ashoton, A.W., et al., J. Biol. Chem. 274, 35562-35570 (1999).) 及びマイグレーションアッセイ (Zeng, H., et al., J. Biol. Chem. 276, 3271-3279 (2001)) のような他のin vitroの血管新生アッセイによっても確認され

た。GnT-Vの血管新生活性を生体外 (ex-vivo) で確認するために、GnT-V Δ 73タンパク質を用いたCAMアッセイを行った。GnT-V Δ 73は、FGF-2と同様にニワトリのマイクロベッセルの血管新生を誘導し、さらにKRKRKKペプチドも同様に血管新生を誘導したが、GnT-V Δ 73及びKRKRKKペプチドによる血管新生の誘導は抗FGF-2中和抗体による処理によって阻害された。これに対して、GnT-V Δ 436及びFSGGPLペプチドは血管新生活性を持っていなかった。これらの結果は、分泌型GnT-V及びGnT-V由来のKRKRKKペプチドはFGF-2の作用を介した血管新生を誘導するが、HUVECの分化・増殖アッセイの結果を考慮すれば、GnT-Vの塩基性領域は内皮細胞上のHSPGからのFGF-2の遊離をもたらす。

【0063】

【発明の効果】

本発明は、血管新生作用を有するタンパク質、及びそれを含有する血管新生促進剤を提供する。かかる血管新生促進剤は、創傷治癒、又は動脈硬化もしくは血栓、血瘤、血管閉塞に関連する病気の予防及び／もしくは治療に有効である。

また、本発明は、膜に貫通している成熟型GnT-Vが分泌型GnT-Vに変換されるのを抑制することによって、血管新生作用を抑制することができる。また、GnT-Vの発現を抑制したり、分泌型GnT-Vがヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合するのを抑制したりすることによっても、血管新生作用を抑制することができる。このような血管新生作用を抑制する物質は、癌の転移などをはじめとする血管新生が原因となる疾患の予防及び／又は治療に有効である。

さらに、前記GnT-Vの塩基性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド及びタンパク質に対する抗体を用いることにより、被検物質中の前記ペプチド及びタンパク質の有無又は量を測定することができ、例えば癌転移の可能性などを知ることができる。

【0064】

【配列表】

<110> SUNTORY LIMITED

<120> Glycosyltransferase GnT-V having angiogenic activity

<130> DS07J617

<160> 12

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223>

<400> 1

Thr Pro Trp Gly Lys

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223>

<400> 2

Asn Ile Pro Ser Tyr Val

1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223>

<400> 3

Val Leu Asp Ser Phe Gly Thr Glu Pro Glu Phe Asn His Ala Asn Tyr

1

5

10

15

Ala

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223>

<400> 4

Asp Leu Gln Phe Leu Leu

1

5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223>

<400> 5

Asn Thr Asp Phe Phe Ile Gly

1

5

<210> 6

<211> 2095

<212> cDNA

<213> Homo sapiens

<223>

<400> 6

CCGGCTGAAG CATCAGAATG GAAGTGAGGA AAGGCAACCA GCTGACACAG GAGCCAGAGT 60

GAGACCAGCA GACTCTCACA CTCAACCTAC ACCATGAATT TGTGTCTATC TTCTACGCGT 120
 TAAGAGCCAA GGACAGGTGA AGTTGCCAGA GAGCA ATG GCT CTC TTC ACT CCG 173
 Met Ala Leu Phe Thr Pro
 1 5
 TGG AAG TTG TCC TCT CAG AAG CTG GGC TTT TTC CTG GTG ACT TTT GGC 221
 Trp Lys Leu Ser Ser Gln Lys Leu Gly Phe Phe Leu Val Thr Phe Gly
 10 15 20
 TTC ATT TGG GGT ATG ATG CTT CTG CAC TTT ACC ATC CAG CAG CGA ACT 269
 Phe Ile Trp Gly Met Met Leu Leu His Phe Thr Ile Gln Gln Arg Thr
 25 30 35
 CAG CCT GAA AGC AGC TCC ATG CTG CGC GAG CAG ATC CTG GAC CTC AGC 317
 Gln Pro Glu Ser Ser Ser Met Leu Arg Glu Gln Ile Leu Asp Leu Ser
 40 45 50
 AAA AGG TAC ATC AAG GCA CTG GCA GAA GAA AAC AGG AAT GTG GTG GAT 365
 Lys Arg Tyr Ile Lys Ala Leu Ala Glu Glu Asn Arg Asn Val Val Asp
 55 60 65 70
 GGG CCA TAC GCT GGA GTC ATG ACA GCT TAT GAT CTG AAG AAA ACC CTT 413
 Gly Pro Tyr Ala Gly Val Met Thr Ala Tyr Asp Leu Lys Lys Thr Leu
 75 80 85
 GCT GTG TTA TTA GAT AAC ATT TTG CAG CGC ATT GGC AAG TTG GAG TCG 461
 Ala Val Leu Leu Asp Asn Ile Leu Gln Arg Ile Gly Lys Leu Glu Ser
 90 95 100
 AAG GTG GAC AAT CTT GTT GTC AAT GGC ACC GGA ACA AAC TCA ACC AAC 509
 Lys Val Asp Asn Leu Val Val Asn Gly Thr Gly Thr Asn Ser Thr Asn
 105 110 115
 TCC ACT ACA GCT GTT CCC AGC TTG GTT GCA CTT GAG AAA ATT AAT GTG 557
 Ser Thr Thr Ala Val Pro Ser Leu Val Ala Leu Glu Lys Ile Asn Val
 120 125 130
 GCA GAT ATC ATT AAC GGA GCT CAA GAA AAA TGT GTA TTG CCT CCT ATG 605

Ala Asp Ile Ile Asn Gly Ala Gln Glu Lys Cys Val Leu Pro Pro Met			
135	140	145	150
GAC GGC TAC CCT CAC TGT GAG GGA AAG ATC AAG TGG ATG AAA GAC ATG	653		
Asp Gly Tyr Pro His Cys Glu Gly Lys Ile Lys Trp Met Lys Asp Met			
155	160	165	
TGG CGT TCA GAT CCC TGC TAC GCA GAC TAT GGA GTG GAT GGA TCC ACC	701		
Trp Arg Ser Asp Pro Cys Tyr Ala Asp Tyr Gly Val Asp Gly Ser Thr			
170	175	180	
TGC TCT TTT TTT ATT TAC CTC AGT GAG GTT GAA AAT TGG TGT CCT CAT	749		
Cys Ser Phe Phe Ile Tyr Leu Ser Glu Val Glu Asn Trp Cys Pro His			
185	190	195	
TTA CCT TGG AGA GCA AAA AAT CCC TAC GAA GAA GCT GAT CAT AAT TCA	797		
Leu Pro Trp Arg Ala Lys Asn Pro Tyr Glu Glu Ala Asp His Asn Ser			
200	205	210	
TTG GCG GAA ATT CGT ACA GAT TTT AAT ATT CTC TAC AGT ATG ATG AAA	845		
Leu Ala Glu Ile Arg Thr Asp Phe Asn Ile Leu Tyr Ser Met Met Lys			
215	220	225	230
AAG CAT GAA GAA TTC CGG TGG ATG AGA CTA CGG ATC CGG CGA ATG GCT	893		
Lys His Glu Glu Phe Arg Trp Met Arg Leu Arg Ile Arg Arg Met Ala			
235	240	245	
GAC GCA TGG ATC CAA GCA ATC AAG TCC CTG GCA GAA AAG CAG AAC CTT	941		
Asp Ala Trp Ile Gln Ala Ile Lys Ser Leu Ala Glu Lys Gln Asn Leu			
250	255	260	
GAA AAG AGA AAG CGG AAG AAA GTC CTC GTT CAC CTG GGA CTC CTG ACC	989		
Glu Lys Arg Lys Arg Lys Lys Val Leu Val His Leu Gly Leu Leu Thr			
265	270	275	
AAG GAA TCT GGA TTT AAG ATT GCA GAG ACA GCT TTC AGT GGT GGC CCT	1037		
Lys Glu Ser Gly Phe Lys Ile Ala Glu Thr Ala Phe Ser Gly Gly Pro			
280	285	290	

CTT GGT GAA TTA GTT CAA TGG AGT GAT TTA ATT ACA TCT CTG TAC TTA 1085
 Leu Gly Glu Leu Val Gln Trp Ser Asp Leu Ile Thr Ser Leu Tyr Leu
 295 300 305 310
 CTG GGC CAT GAC ATT AGG ATT TCA GCT TCA CTG GCT GAG CTC AAG GAA 1133
 Leu Gly His Asp Ile Arg Ile Ser Ala Ser Leu Ala Glu Leu Lys Glu
 315 320 325
 ATC ATG AAG AAG GTT GTA GGA AAC CGA TCT GGC TGC CCA ACT GTA GGA 1181
 Ile Met Lys Lys Val Val Gly Asn Arg Ser Gly Cys Pro Thr Val Gly
 330 335 340
 GAC AGA ATT GTT GAG CTC ATT TAC ATT GAT ATT GTA GGA CTT GCT CAA 1229
 Asp Arg Ile Val Glu Leu Ile Tyr Ile Asp Ile Val Gly Leu Ala Gln
 345 350 355
 TTC AAG AAA ACT CTT GGA CCA TCC TGG GTT CAT TAC CAG TGC ATG CTC 1277
 Phe Lys Lys Thr Leu Gly Pro Ser Trp Val His Tyr Gln Cys Met Leu
 360 365 370
 CGA GTC CTT GAT TCA TTT GGT ACT GAA CCC GAA TTT AAT CAT GCA AAT 1325
 Arg Val Leu Asp Ser Phe Gly Thr Glu Pro Glu Phe Asn His Ala Asn
 375 380 385 390
 TAT GCC CAA TCG AAA GGC CAC AAG ACC CCT TGG GGA AAA TGG AAT CTG 1373
 Tyr Ala Gln Ser Lys Gly His Lys Thr Pro Trp Gly Lys Trp Asn Leu
 395 400 405
 AAC CCT CAG CAG TTT TAT ACC ATG TTC CCT CAT ACC CCA GAC AAC AGC 1421
 Asn Pro Gln Gln Phe Tyr Thr Met Phe Pro His Thr Pro Asp Asn Ser
 410 415 420
 TTT CTG GGG TTT GTG GTT GAG CAG CAC CTG AAC TCC AGT GAT ATC CAC 1469
 Phe Leu Gly Phe Val Val Glu Gln His Leu Asn Ser Ser Asp Ile His
 425 430 435
 CAC ATT AAT GAA ATC AAA AGG CAG AAC CAG TCC CTT GTG TAT GGC AAA 1517
 His Ile Asn Glu Ile Lys Arg Gln Asn Gln Ser Leu Val Tyr Gly Lys

440	445	450	
GTG GAT AGC TTC TGG AAG AAT AAG AAG ATC TAC TTG GAC ATT ATT CAC			1565
Val Asp Ser Phe Trp Lys Asn Lys Lys Ile Tyr Leu Asp Ile Ile His			
455	460	465	470
ACA TAC ATG GAA GTG CAT GCA ACT GTT TAT GGC TCC AGC ACA AAG AAT			1613
Thr Tyr Met Glu Val His Ala Thr Val Tyr Gly Ser Ser Thr Lys Asn			
475	480	485	
ATT CCC AGT TAC GTG AAA AAC CAT GGT ATC CTC AGT GGA CGG GAC CTG			1661
Ile Pro Ser Tyr Val Lys Asn His Gly Ile Leu Ser Gly Arg Asp Leu			
490	495	500	
CAG TTC CTT CTT CGA GAA ACC AAG TTG TTT GTT GGA CTT GGG TTC CCT			1709
Gln Phe Leu Leu Arg Glu Thr Lys Leu Phe Val Gly Leu Gly Phe Pro			
505	510	515	
TAC GAG GGC CCA GCT CCC CTG GAA GCT ATC GCA AAT GGA TGT GCT TTT			1757
Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Leu Glu Ala Ile Ala Asn Gly Cys Ala Phe			
520	525	530	
CTG AAT CCC AAG TTC AAC CCA CCC AAA AGC AGC AAA AAC ACA GAC TTT			1805
Leu Asn Pro Lys Phe Asn Pro Pro Lys Ser Ser Lys Asn Thr Asp Phe			
535	540	545	550
TTC ATT GGC AAG CCA ACT CTG AGA GAG CTG ACA TCC CAG CAT CCT TAC			1853
Phe Ile Gly Lys Pro Thr Leu Arg Glu Leu Thr Ser Gln His Pro Tyr			
555	560	565	
GCT GAA GTT TTC ATC GGG CGG CCA CAT GTG TGG ACT GTT GAC CTC AAC			1901
Ala Glu Val Phe Ile Gly Arg Pro His Val Trp Thr Val Asp Leu Asn			
570	575	580	
AAT CAG GAG GAA GTA GAG GAT GCA GTG AAA GCA ATT TTA AAT CAG AAG			1949
Asn Gln Glu Glu Val Glu Asp Ala Val Lys Ala Ile Leu Asn Gln Lys			
585	590	595	
ATT GAG CCA TAC ATG CCA TAT GAA TTT ACG TGC GAG GGG ATG CTA CAG			1997

Ile Glu Pro Tyr Met Pro Tyr Glu Phe Thr Cys Glu Gly Met Leu Gln

600

605

610

AGA ATC AAT GCT TTC ATT GAA AAA CAG GAC TTC TGC CAT GGG CAA GTG 2045

Arg Ile Asn Ala Phe Ile Glu Lys Gln Asp Phe Cys His Gly Gln Val

615

620

625

630

ATG TGG CCA CCC CTC AGC GCC CTA CAG GTC AAG CTT GCT GAG CCC GGG 2093

Met Trp Pro Pro Leu Ser Ala Leu Gln Val Lys Leu Ala Glu Pro Gly

635

640

645

CC

2095

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223>

<400> 7

Lys Ser Leu Ala Glu Lys Gln Asn Leu Glu Lys Arg Lys Arg Lys Lys

1

5

10

15

<210> 8

<211> 24

<212> cDNA

<213> Artificial Sequence

<223>

<400> 8

GGGAGTGAGG ATGATGTAGG GAAG

24

<210> 9

<211> 24

<212> cDNA

<213> Artificial Sequence

<223>

<400> 9

ATGGGGCAGA GGAAGTTACG TTAT

24

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223>

<400> 10

Gly Arg Gly Lys Arg Arg

1

5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> KRKRKK peptide

<400> 11

Lys Arg Lys Arg Lys Lys

1

5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> FSGGPL peptide

<400> 12

Phe Ser Gly Gly Pro Leu

1

5

【図面の簡単な説明】

【図1】 各細胞の培養液で処理されたHUV ECの分化・増殖を、 $[^3\text{H}]$ ーチミジンの取り込み量を指標に示した。なお、CRTは、HUV ECの培養に用いた通常の新鮮な培地である。

【図2】 GnT-V Δ 73の添加量と、HUV ECの分化・増殖との関係を示す図である。

【図3】 図3Aは、各GnT-V欠失変異体のアミノ酸配列の概略を示す図である。図3Bは、各GnT-V欠失変異体によるHUV ECの分化・増殖亢進作用を示す図である。

【図4】 GnT-Vの塩基クラスター領域のアミノ酸配列と、VEGF₁₈₉、P1GF-2及びHB-EGFのアミノ酸配列との類似性を示す図である。

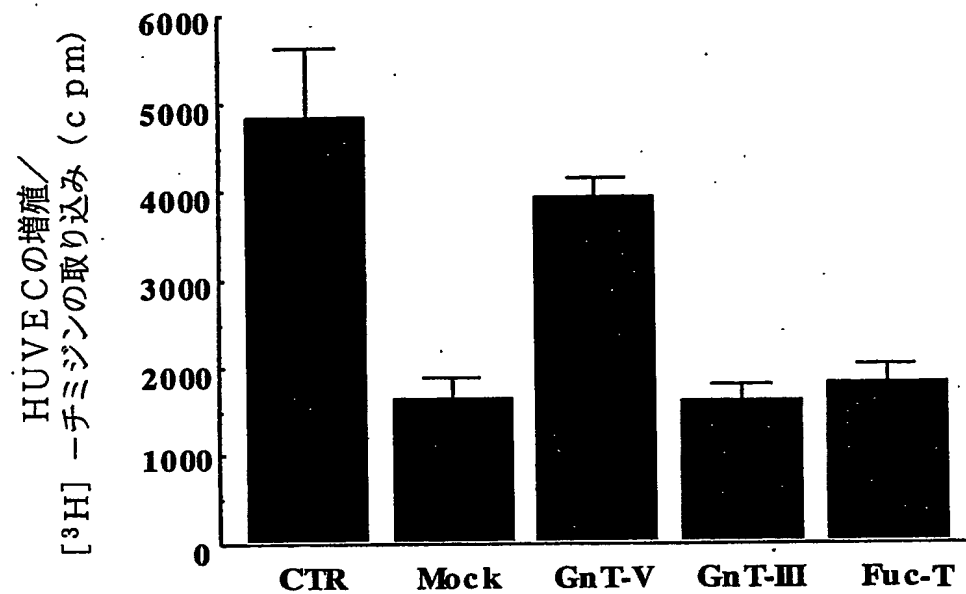
【図5】 GnT-Vの各種欠失変異体及び合成ペプチドによるFGF-2の放出量を示す図である。

【図6】 GnT-Vの各種欠失変異体及び合成ペプチドによるHUV ECの分化・増殖亢進作用を示す図である。

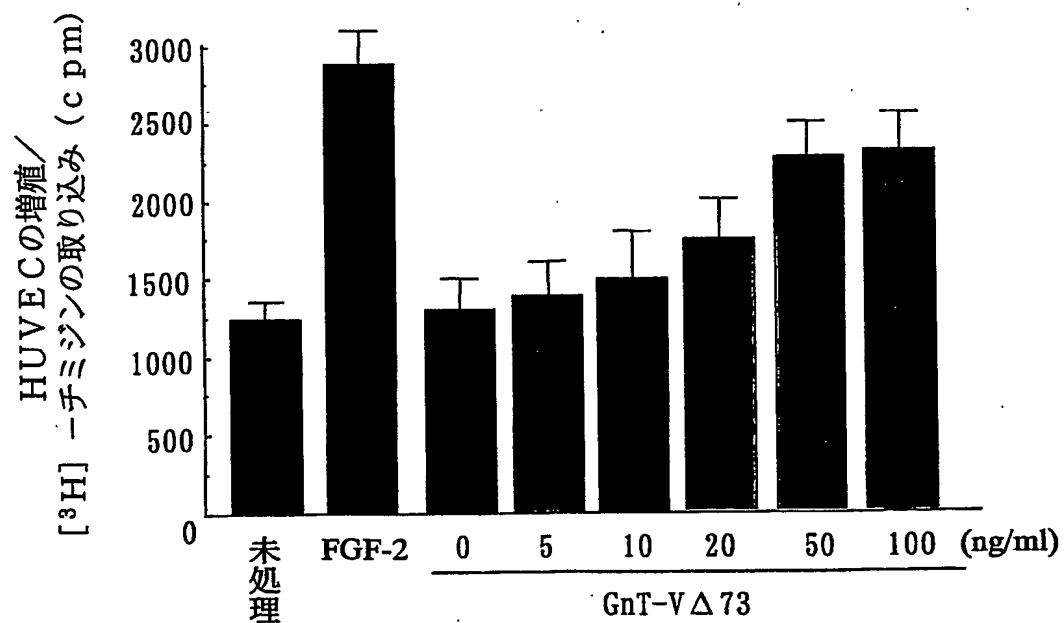
【図7】 GnT-Vによる癌血管新生の誘導を示す概略図である。塩基性アミノ酸クラスター領域を含む分泌型GnT-Vは、FGF-2と競合して細胞表面のHSPGに結合し、その結果、FGF-2の遊離が起こり、標的細胞上のFGF-2レセプターが刺激される。

【書類名】 図面

【図 1】



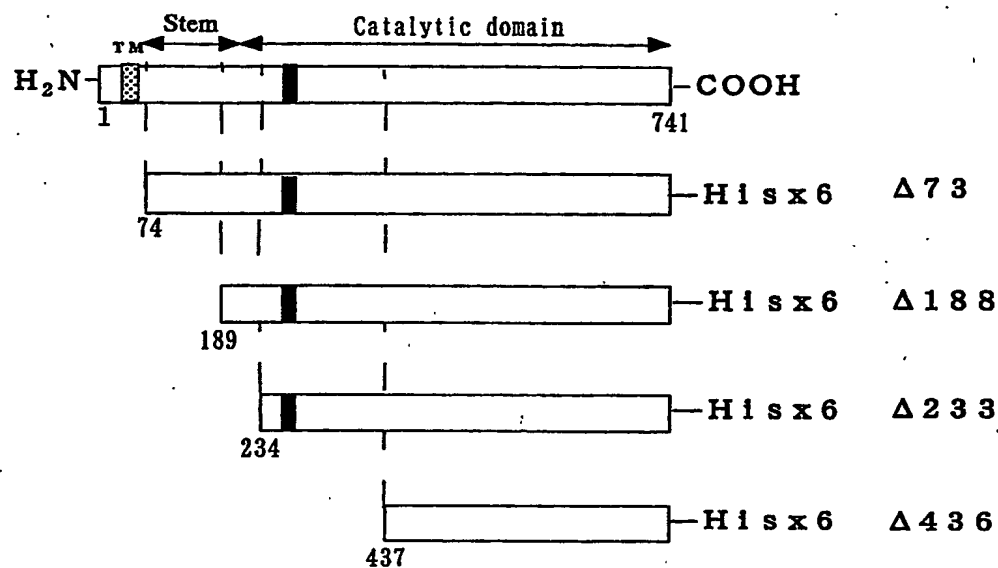
【図 2】



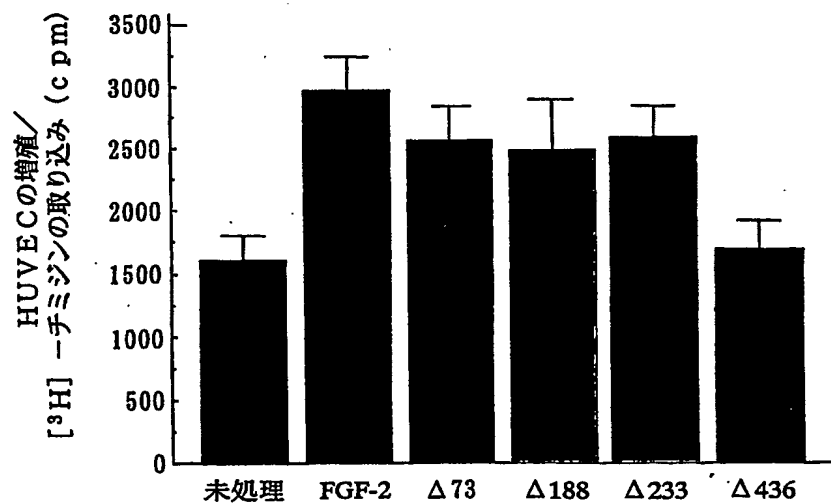
BEST AVAILABLE COPY

【図3】

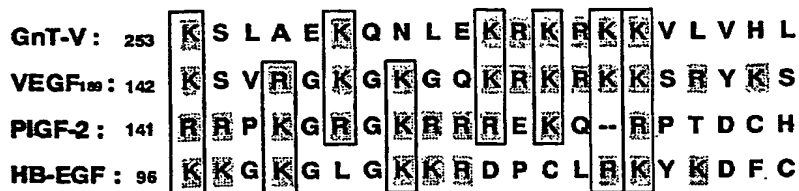
(A)



(B)

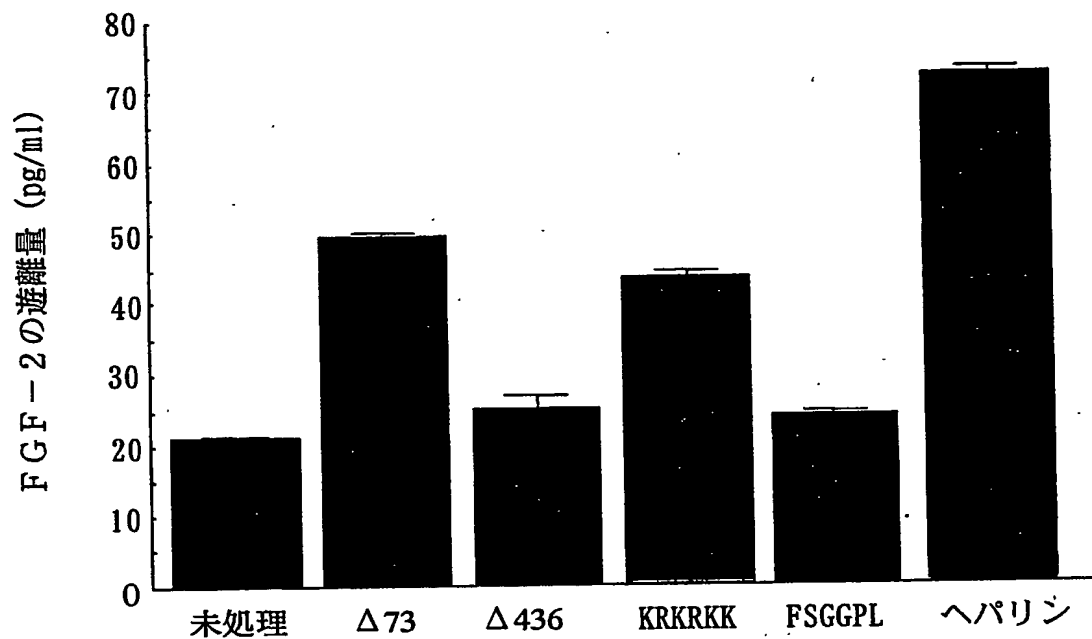


【図4】

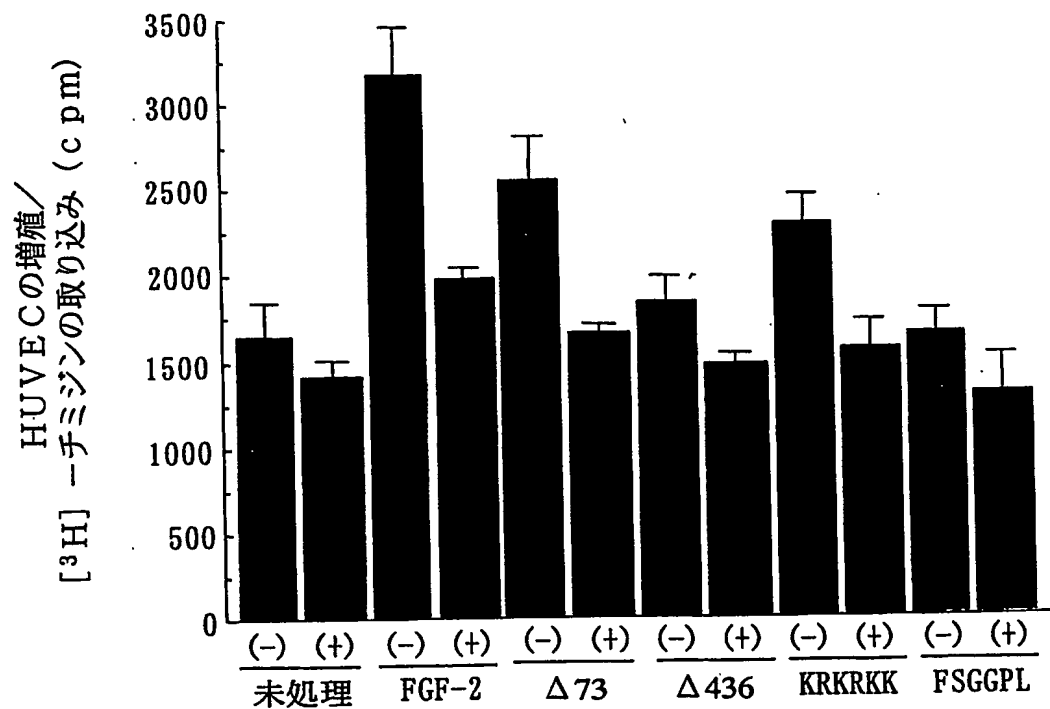


BEST AVAILABLE COPY

【図5】

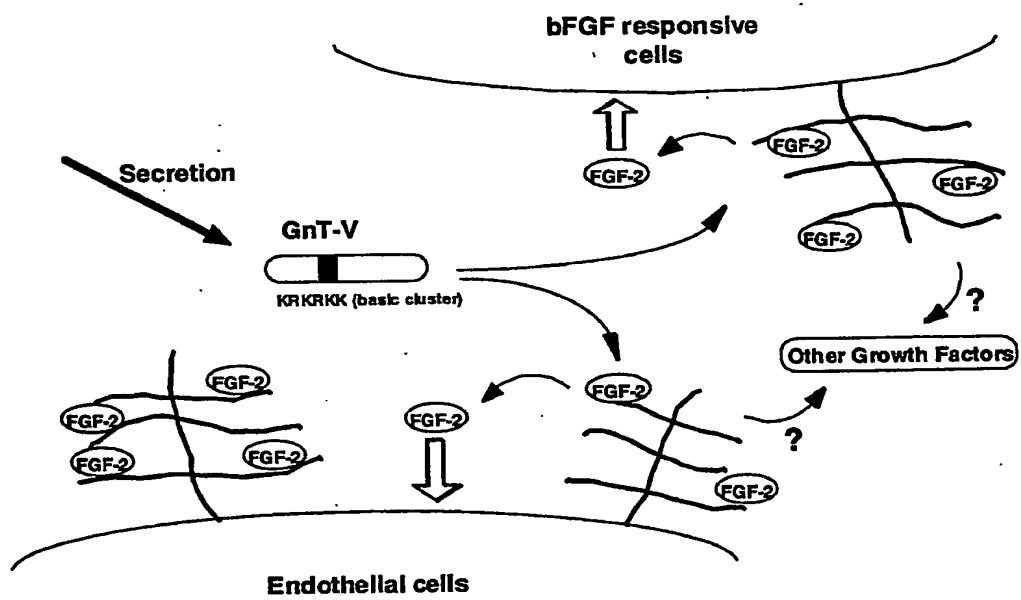


【図6】



BEST AVAILABLE COPY

【図 7】



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の目的は糖転移酵素GnT-Vの癌転移・増殖において果たす役割を解明することにより、癌治療における最も重要な課題である癌転移・増殖に係る新たな治療ターゲットを提供することである。

【解決手段】 血管新生作用を有し、 $\beta 1, 6-N$ -アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの塩基性アミノ酸クラスター領域を含むペプチド又はタンパク質。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
氏 名 サントリー株式会社